

EFEK PENAMBAHAN FRAKSI SEMI POLAR (F19-23) EKSTRAK METANOLIKMENIRAN (*Phyllanthus niruri*) TERHADAP DAYA HAMBAT Amoxicillin DAN Chloramphenicol PADA *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Faza Afsiyura, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Salah satu cara yang efektif untuk menurunkan resistensi antimikroba adalah dengan penambahan adjuvan. *Phyllanthus niruri* berpotensi untuk menjadi adjuvan Amoxicillin dan Chloramphenicol, namun, senyawa yang berinteraksi dengan antibiotik tersebut belum diketahui. Pada penelitian ini akan dilakukan pemisahan senyawa-senyawa aktif dengan fraksinasi dan diuji kombinasi dengan antibiotik dalam menghambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Fraksi yang diuji pada penelitian ini adalah fraksi 19-23 yang bersifat semipolar.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian experimental in vitro. Ekstraksi dilakukan dengan maserasi yang dilanjutkan dengan fraksinasi kolom. Fraksi yang diambil akan diuji daya hambat dengan metode Kirby-Bauer dan diinterpretasi berdasarkan *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST)*. Kemudian dilakukan uji fitokimia dengan kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan dengan pewarnaan *Dragendorff*, $FeCl_3$, dan *Formaldehyde*.

Hasil: Hasil fraksi 19-20 tidak ditemukan senyawa golongan alkaloid, fenol maupun saponin namun, pada fraksi 21-23 ditemukan senyawa fenol. Fraksi 19-23 memiliki aktivitas secara tunggal terhadap bakteri *S. aureus* dan tidak semua pada *E. coli*. ZOI terbesar pada fraksi 21 terhadap *S. aureus* ($15 \pm 1,7$ mm) dan fraksi 23 terhadap *E. coli* (4 ± 8 mm). Kombinasi Fraksi 23 dengan kloramfenikol memiliki interaksi antagonis terhadap *S. aureus* dengan ZOI kombinasi ($9,7 \pm 4$ mm) lebih kecil dari ZOI antibiotik tunggal (16 ± 1 mm) dan ZOI herbal tunggal (11 ± 2 mm). Kombinasi Fraksi 19, fraksi 22 pada amoksisilin didapatkan interaksi sinergis pada *S. aureus*. Fraksi lain tidak ditemukan adanya interaksi.

Kesimpulan: Fraksi 19-23 ekstrak metanolik meniran memiliki daya hambat secara tunggal terhadap bakteri *S. aureus* dan tidak semua pada *E. coli*. Fraksi 23 bersifat antagonis dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus*. Fraksi 19 dan fraksi 22 bersifat sinergis dengan amoksisilin terhadap *S. aureus*.

Kata Kunci: *Phyllanthus niruri*, L., Amoxicillin, Chloramphenicol, Antibiotik

THE COMBINATION EFFECTS OF SEMI POLAR FRACTION (F19-F23) METANOLIC EXTRACT OF CHAMBER BITTER WITH Amoxicillin AND Chloramphenicol TO INHIBIT *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

Faza Afsiyura, Zainul Fadli, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: One effective way to reduce antimicrobial resistance is to add adjuvants. Herbal *Phyllanthus niruri* has the potential to be an adjuvant to Amoxicillin and Chloramphenicol, however, the compounds that interact with these antibiotics are not yet known. In this study the separation of active compounds will be carried out by fractionation and tested in combination with antibiotics to inhibit the bacteria *S. aureus* and *E. coli*. The fractions tested in this study were fraction 19-23.

Methods: This research is an in vitro experimental research. Extraction is done by maceration followed by column fractionation. The fraction taken will be tested for inhibition used the Kirby-Bauer method and interpreted based on the *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST)*. Then phytochemical tests were carried out by thin layer chromatography (TLC) which was done by staining with *Dragendorff*, $FeCl_3$, and *Formaldehyde*.

Results: No alkaloid, phenol or saponin were found in fraction 19-20, however in fraction 21-23 phenols were found. Fractions 19-23 has by itself activity against *S. aureus* and not all of *E. coli*. Fraction 21 had the largest ZOI against *S. aureus*, Fraction 23 against *E. coli*. The ZOI in fraction 21 was against *S. aureus* (15 ± 1.7 mm) and fraction 23 was against *E. coli* (4 ± 8 mm). The combination of Fraction 23 with chloramphenicol has antagonistic interaction with *S. aureus* with ZOI (9.7 ± 4 mm) smaller than a single antibiotic (16 ± 1 mm) and a single herb (11 ± 2 mm). Combination fraction 19 and fraction 22 with amoxicillin has synergistic interaction with *S. aureus*. No other interaction were found.

Conclusion: Fraction 19-23 methanolic extract of Chamber bitter showed inhibitory effect against *S. aureus* and not all of *E. coli*. Fraction 23 has antagonistic interaction with chloramphenicol against *S. aureus*. Fraction 19 and fraction 22 has synergistic interaction with amoxicillin against *S. aureus*.

Keywords: *Phyllanthus niruri*, L., Amoxicillin, Chloramphenicol, Antibiotic

*Correspondence:

Rio Risandiansyah

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Address : Jl. MT Haryono 193, Malang City, East Java, Indonesian, 65145

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi menular merupakan penyebab utama kematian di dunia. Hal ini diakibatkan oleh munculnya penyakit infeksi menular baru dan munculnya kembali infeksi lama¹. Salah satu penyebab tingginya masalah infeksi adalah meningkatnya angka resistensi. Menurut *Centers for Disease Control and Prevention*, setiap tahunnya di Amerika Serikat terdapat 2.000.000 orang yang terinfeksi oleh bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik dan kurang lebih 23.000 orang meninggal setiap tahunnya akibat langsung dari resistensi². Data lain menyebutkan bahwa kematian akibat resistensi antimikroba (AMR) di dunia sekitar 700.000 jiwa dan diperkirakan pada tahun 2050 akan menyebabkan kematian 10 juta jiwa/tahun³.

Salah satu cara yang relatif efektif dalam mengurangi angka resistensi yaitu dengan kombinasi tanaman herbal dengan antibiotik⁴. Kombinasi ini menjadi prioritas penelitian karena dinilai lebih ekonomis dibandingkan metode penemuan obat konvensional⁴. Tujuan dari terapi kombinasi yaitu mengoptimalkan fungsi obat dan mengurangi resistensi, hal ini memungkinkan obat untuk mencapai penggunaan klinis yang jauh lebih cepat dengan biaya pengembangan yang rendah⁴.

Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa interaksi antara herbal meniran dengan kombinasi kloramfenikol pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus* adalah aditif atau tidak adanya interaksi dalam menurunkan atau meningkatkan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Hal ini diduga pada penelitian sebelumnya merupakan ekstrak kasar yang masih memiliki berbagai macam senyawa aktif, sehingga diduga senyawa-senyawa tersebut dapat saling berinteraksi dan dapat mempengaruhi interaksi dengan antibiotik pada bakteri *E. coli* dan *S. aureus*⁵.

Pada penelitian ini akan dilakukan fraksinasi untuk memisahkan senyawa dalam ekstrak herbal meniran dan mengambil senyawa semipolar dari pelarut metanol dan etil asetat perbandingan 50% antara keduanya (fraksi 19-23), dengan harapan mendapatkan senyawa aktif yang bekerja sebagai antibiotik yaitu alkaloid (sekurinin), flavonoid (kuersetin, kuersitrin, isokuersitrin, astragalin, nirunin, niruside, rutin, leukodelfinidin dan galakotekin), lignan (filantin dan hipofilantin), fenol (asam galat, *epicatechin*, *catechin*, *gallocatechin*, *epigallocatechin*, *epicatechin 3-O-gallate* dan *epigallocatechin 3-O-gallate*)^{6,7}. Selain itu akan dilakukan uji fitokimia, dan pemberian fraksi metanolik meniran (*Phyllanthus niruri* L.) pada antibiotik amoxicillin dan chloramphenicol terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang bertujuan untuk mendapatkan zona hambat pada uji *Zone of Inhibition* (ZOI)

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental analitik laboratorik⁸. Penelitian ini

dilakukan dari bulan Januari hingga April 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA).

Pembuatan Ekstrak Metanolik *Phyllanthus niruri*, L.

Simplisia herbal meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Ekstraksi meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dibuat dengan metode maserasi modifikasi. Simplisia herbal sebanyak 200 gr, dicampur dengan metanol PA 96% sebanyak 2000 ml, bagi rata kedalam 5 buah *erlenmeyer* ukuran 500 ml. *Erlenmeyer* ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 24 jam *dishaker water bath*. Ekstrak disaring dengan *vacuum buchner* dan dilakukan evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 55 °C dengan kecepatan 4. Ekstrak yang sudah kental disimpan dalam oven dengan suhu 40°C selama 3 hari sampai menjadi pasta dan disimpan sebagai stok sampai penggunaan lebih lanjut.

Metode Fraksinasi *Phyllanthus niruri*, L.

Fraksinasi dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam berupa *silica gel* dan fasa gerak yang digunakan adalah pelarut polar hingga non polar. Pelarut yang digunakan adalah etil asetat, metanol dan air. Hasil fraksi yang didapat ditampung ke dalam tabung vial yang berbeda sesuai dengan setiap perbedaan warna yang keluar, dan dilakukan uji KLT. Uji KLT yang dilakukan menggunakan F254 *silica plate* dengan perbandingan pelarut metanol dan etil asetat 7:3. Kemudian plat KLT dihitung nilai *Retention Factor* (RF) nya dengan membagi jarak tempuh komponen dengan jarak tempuh pelarut.

Metode Pembuatan Larutan Antibiotik

Antibiotik kloramfenikol dan amoksisilin masing-masing 1000 mg dilarutkan kedalam 10 ml *aquadest* steril. Konsentrasi akhir antibiotik yang didapatkan adalah 100mg/ml pada kloramfenikol dan 10 mg/ml pada amoksisilin

Metode *PourPlate* untuk Pembuatan Metode Uji

Koloni bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai warnanya berubah menjadi keruh. Tabung reaksi kemudian dilakukan homogenisasi dengan *vortex*. Sampel bakteri diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam kuvet untuk dilihat pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dicatat dan dilakukan pengenceran sesuai dengan rumus berikut $0,2 : \text{Faktor dilusi} = (\text{abs. sampel} / \text{abs. target}) \times \text{volume sampel}$. Suspensi bakteri diencerkan sesuai rumus di atas dengan NaCl 0,9% steril. Bakteri yang sudah diencerkan hingga jumlahnya 10^8 dilarutkan dalam media agar sebanyak 1% (10 ml/1 L media).

Uji Fitokimia *Phyllanthus niruri*, L.

Uji fitokimia kandungan alkaloid dilakukan dengan reagen *Dragendorff*. Ekstrak meniran dianggap memiliki kandungan alkaloid jika berubah warna menjadi kuning keemasan⁹. Uji fitokimia kandungan fenol dilakukan dengan reagen $FeCl_3$. Ekstrak meniran dianggap memiliki kandungan fenol jika berubah warna menjadi biru kehitaman¹⁰. Uji fitokimia kandungan steroid, alkaloid, saponin, dan derivat *phenothiazine* dilakukan dengan reagen *formaldehyde*, ekstrak meniran dianggap memiliki kandungan tersebut jika berubah warna menjadi kecoklatan¹¹.

Zone of Inhibition (ZOI) Tunggal dan Kombinasi

Uji ZOI dilakukan dengan metode sumuran media agar dilubangi menggunakan alat *cork borer* berukuran 6 mm. Setiap sumuran diisi dengan fraksi aktif herbal tunggal, antibiotik tunggal, dan kombinasi keduanya sesuai dosis yang ditentukan. Kombinasi herbal dan antibiotik diinterpretasi dengan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Zona bening disekitar lubang menandakan adanya aktivitas antibakteri¹².

Uji ZOI dilakukan menggunakan *E. coli* dan *S. aureus*, fraksi herbal Meniran (*Phyllanthus niruri*) serta *amoxicillin* dan *chloramphenicol* yang sudah diencerkan sesuai dosis yang ditentukan. Biakan agar kemudian dilubangi dengan *cork borer* sebanyak 10 lubang dengan pola 3-4-3, dan diisi dengan fraksi herbal yang berbeda dan antibiotik sesuai dengan dosis yang ditentukan lalu bakteri diinkubasi bakteri suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu periksa adatinaknya zona hambat disekitar lubang. Zona hambat diukur diameternya menggunakan penggaris satuan millimeter (mm).

Interpretasi Interaksi

Interpretasi hasil ZOI kombinasi menurut metode AZDAST interaksi yang diuji adalah antara antibiotik (A) dan herbal (B), dikatakan sinergis apabila diameter zona bening yang terbentuk pada kombinasi antibiotik dan herbal (A+B) lebih besar dari antibiotik tunggal (A) dan herbal tunggal (B) dan lebih kecil atau lebih besar dari herbal kombinasi (AA) dan antibiotik kombinasi (BB). Antagonis apabila A+B lebih kecil dari A atau B. Aditif apabila A+B sama dengan AA dan atau BB. Potensiasi apabila salah satu dari A atau B sama dengan nol, A+B lebih besar dari A dan B, dan lebih kecil atau lebih besar dari AA dan atau BB. Tidak dapat dibedakan apabila A+B sama dengan salah satu dari A atau B¹³.

Analisa Data Statistik

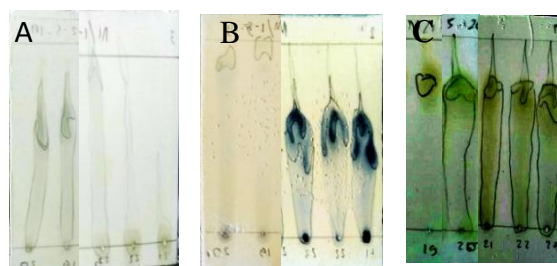
Analisa hasil ZOI kombinasi diukur menggunakan penggaris dengan satuan mm dan dibuat menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rata-

rata dan standar deviasi. Uji Statistik menggunakan uji non parametrik *Mann-Whitney Test* untuk melihat perbedaan yang signifikan antara ZOI kombinasi dan ZOI tunggal untuk setiap fraksi aktif herbal.

HASIL PENELITIAN

Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia digunakan untuk proses *screening* kandungan senyawa aktif pada fraksi semi polar (F19-23) ekstrak metanolik meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) dengan menyempatkan reagen *dragendorff*, $FeCl_3$, dan *formaldehyde* pada plat KLT seperti yang terlihat pada gambar dan tabel 1.



Gambar 1 Hasil KLT F14-18 yang sudah disemprot reagen; **A.** disemprot dengan reagen *dragendorff*; **B.** disemprot dengan reagen $FeCl_3$; **C.** Disemprot dengan reagen *formaldehyde* (Gambar disertai dengan perubahan kontras)

Tabel 1 Hasil Perhitungan Rf pada KLT F19-F23

No. Fraksi	Spray reagen	Hasil	Senyawa
F19	<i>Dragendorff</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
	$FeCl_3$	-	-
F20	<i>Dragendorff</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
	$FeCl_3$	-	-
F21	<i>Dragendorff</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
	$FeCl_3$	+	Fenol
	$FeCl_3$	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
F22	<i>Dragendorff</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-
	$FeCl_3$	+	Fenol
	$FeCl_3$	-	-
	<i>Dragendorff</i>	-	-
F23	$FeCl_3$	-	-
	$FeCl_3$	+	Fenol
	<i>Dragendorff</i>	-	-
	<i>Formaldehyd</i>	-	-
	<i>Formaldehyde</i>	-	-

Keterangan hasil penyempatkan reagen *Dragendorff*, $FeCl_3$ dan *Formaldehyde* pada fraksi 19-23

Gambar 1 dan tabel 1 menunjukkan bahwa dengan menyemprotkan reagen *dragendorff*, *formaldehyde*, dan $FeCl_3$ pada fraksi 19-23 didapatkan warna yang berbeda

Fraksi 19 pada pewarnaan *Dragendorff* di dapatkan satu spot dengan warna hijau, pada pewarnaan $FeCl_3$ didapatkan satu spot berwarna abu-abu dan pada pewarnaan *formaldehyde* di dapatkan satu spot berwarna hijau.

Fraksi 20 pada pewarnaan *Dragendorff* di dapatkan satu spot yang tidak berwarna, sedangkan pada pewarnaan dengan *formaldehyde* didapatkan dua spot yaitu berwarna hijau dan tidak berwarna dan pada pewarnaan $FeCl_3$ di dapatkan warna abu-abu.

Pada fraksi ke-21 dengan pewarnaan *Dragendorff* di dapatkan satu spot yang tidak berwarna, pewarnaan *formaldehyde* di dapatkan dua spot yang berwarna hijau dan tidak berwarna sedangkan pada pewarnaan $FeCl_3$ di dapatkan dua spot berwarna biru tua dan biru muda.

Pada fraksi ke-22 dengan pewarnaan *Dragendorff* didapatkan dua spot yang tidak berwarna, pada pewarnaan $FeCl_3$ di dapatkan dua spot dengan warna biru tua dan biru muda sedangkan pada pewarnaan dengan *formaldehyde* didapatkan dua spot yang berwarna hijau dan tidak berwarna.

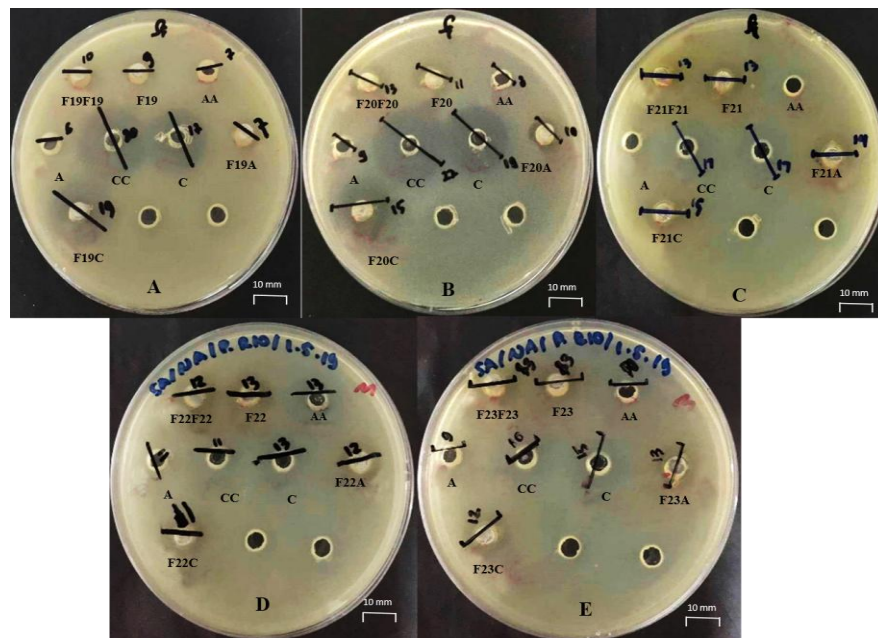
Pada fraksi ke-23 dengan pewarnaan

Dragendorff didapatkan satu spot tidak berwarna sedangkan dengan pewarnaan $FeCl_3$ didapatkan warna biru muda dan biru tua dan pada pewarnaan dengan *formaldehyde* didapatkan dua spot berwarna kuning kehijauan.

Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Antibiotik Tunggal Amoksisilin dan Kloramfenikol pada Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

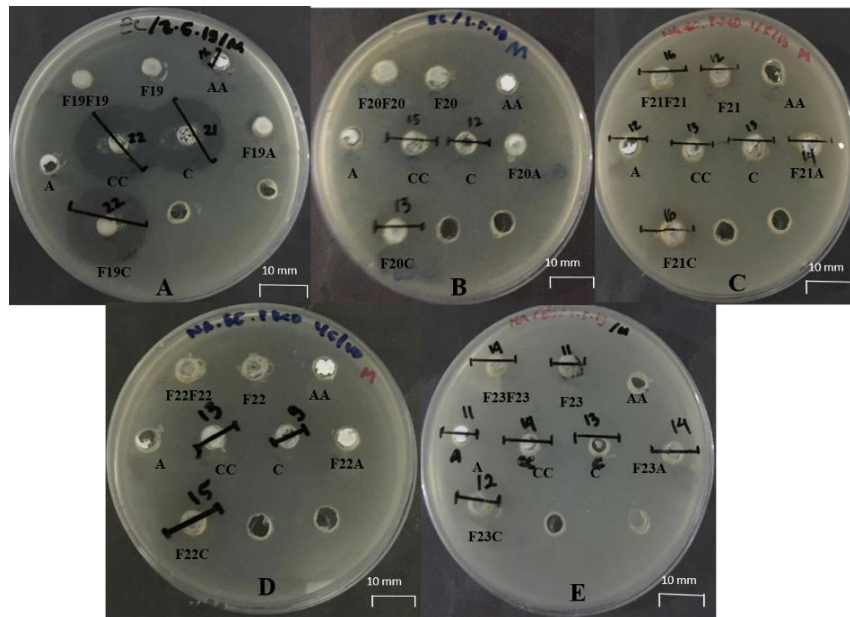
Zone Of Inhibition (ZOI) merupakan uji yang dilakukan untuk melihat efektifitas bahan coba dalam menghambat mikroorganisme¹⁴. ZOI ditandai dengan adanya zona bening disekitar sumuran dan hasilnya didapatkan dengan mengukur diameter menggunakan mistar dengan satuan mm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wardati(2019) zona inhibisi amoksisilin pada dilusi ke-1 dengan konsentrasi 10mg/ml didapatkan hasil ZOI dengan diameter $21,3 \pm 1,1$ mm, pada antibiotik kloramfenikol didapatkan ZOI $15,3 \pm 2,08$. Amoksisilin memiliki ZOI lebih besardibandingkan dengan kloramfenikol pada bakteri *S.aureus*¹⁵.

Sedangkan pada bakteri *E.coli* antibiotik amoksisilin dengan konsentrasi 100mg/ml didapatkan ZOI dengan diameter $11,21 \pm 6,10$ mm dan pada antibiotik kloramfenikol didapatkan ZOI 14 ± 1 mm. Kloramfenikol memiliki ZOI lebih besar dibandingkan dengan Amoksisilin pada bakteri



Gambar 2 Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Meniran dan Antibiotik pada Bakteri *S.aureus*; **A.** Fraksi 19 ekstrak metanolik meniran, F19F19= Fraksi 19 dosis 30 μ l, F19= Fraksi 19dosis 15 μ l, AA= Amoksisilin dosis 30 μ l, A= Amoksisilin dosis 15 μ l, CC= Kloramfenikol dosis 30 μ l, C= Kloramfenikol dosis 15 μ l, F19A= Kombinasi fraksi 19 dan amoksisilin, F19C= Kombinasi fraksi 19 dan kloramfenikol; **B.** Fraksi 20 ekstrak metanolik meniran; **C.** Fraksi 21 ekstrak metanolik meniran; **D.** Fraksi 22 ekstrak metanolik meniran; **E.** Fraksi 23 ekstrak metanolik meniran

E.coli



Gambar 3 Hasil Pengujian Bersama ZOI Fraksi Meniran dan Antibiotik pada Bakteri *E.coli*; **A.** Fraksi 19 ekstrak metanolik meniran, F19F19= Fraksi 19 dosis 30 μ l, F19= Fraksi 19 dosis 15 μ l, AA= Amoksisilin dosis 30 μ l, A= Amoksisilin dosis 15 μ l, CC= Kloramfenikol dosis 30 μ l, C= Kloramfenikol dosis 15 μ l, F19A= Kombinasi fraksi 19 dan amoksisilin, F19C= Kombinasi fraksi 19 dan kloramfenikol; **B.** Fraksi 20 ekstrak metanolik meniran; **C.** Fraksi 21 ekstrak metanolik meniran; **D.** Fraksi 22 ekstrak metanolik meniran; **E.** Fraksi 23 ekstrak metanolik meniran.

Hasil Uji Zona Inhibisi pada Pengujian Tunggal Fraksi Meniran dengan Antibiotik pada Bakteri *S.aureus*

Pengujian ZOI tunggal dan kombinasi antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol terhadap bakteri *S.aureus* dilakukan dalam plate yang sama. Dimana setiap plate akan memiliki sumuran untuk sampel fraksi tunggal (Fx), dosis dua kali fraksi tunggal (FxFx); antibiotik amoksisilin tunggal (A), dua kali dosis antibiotik amoksisilin tunggal (AA); antibiotik kloramfenikol tunggal (C), dua kali dosis antibiotik kloramfenikol tunggal (CC). Dokumentasi dapat dilihat pada gambar 2, sedangkan hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 2.

Hasil Uji Zona Inhibisi pada Pengujian Tunggal Fraksi Semi Polar (F19-F23) Ekstrak Metanolik Meniran Terhadap Bakteri *S.aureus*

Berdasarkan Tabel 2 dan Gambar 2 pengujian tunggal fraksi herbal meniran dengan dosis 15 μ l (Fx) pada bakteri *S.aureus* didapatkan zona inhibisi pada semua fraksi yang diteliti yaitu F19-F23. Aktivitas yang paling tinggi terdapat pada fraksi 21 dengan ZOI $15 \pm 1,7$, diikuti F20 dengan ZOI $12,3 \pm 1,1$, diikuti F22 dan F23 memiliki ZOI yang sama yaitu 11 ± 2 dan F19 memiliki aktifitas paling rendah dengan ZOI $7,6 \pm 1,1$.

Pada pengujian tunggal fraksi herbal meniran dengan dosis 30 μ l (FxFx) aktivitas paling tinggi terdapat pada F21F21 dengan ZOI $17,3 \pm 3,7$, diikuti F20F20 dengan ZOI $14,6 \pm 1,5$, diikuti F22F22 dengan ZOI $13,3 \pm 1,5$ dan yang memiliki

aktivitas paling kecil yaitu F19F19 dan F23F23 dengan ZOI 10 ± 1 .

Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Herbal Meniran dengan Antibiotik Kloramfenikol dan Amoksisilin Terhadap Bakteri *S. aureus*

Berdasarkan gambar 2 dan tabel 2,3 diatas uji kombinasi antara fraksi meniran dengan antibiotik kloramfenikol didapatkan hasil, fraksi 19,20,21,22 tidak signifikan yaitu $p > 0,05$ sedangkan pada fraksi 23 didapatkan hasil yang signifikan $p < 0,05$ setelah dilakukan uji statistik non parametrik *Mann-Whitney Test*, sehingga fraksi 19 sampai 22 memiliki interaksi *not distinguishable* dan fraksi 23 memiliki interaksi antagonis karena hasil kombinasi lebih kecil dibandingkan dengan herbal tunggal dan antibiotik tunggal.

Kombinasi antara fraksi dengan antibiotik amoksisilin didapatkan hasil sinergis pada fraksi 19 dan 22. Pada fraksi 19 ZOI kombinasi sebesar 8 ± 1 lebih besar dibanding ZOI antibiotik tunggal 6 ± 0 dan herbal tunggal $7,6 \pm 0$ sedangkan pada fraksi 22 ZOI kombinasi $12,3 \pm 0,5$ lebih besar dibandingkan antibiotik tunggal 10 ± 1 dan herbal tunggal 11 ± 2 . Pada fraksi yang lain di dapatkan interaksi *Not distinguishable* pada fraksi 20 dan 21 karena interaksi tidak dapat dibedakan antara tunggal dengan kombinasi

Hasil Uji Zona Inhibisi pada Pengujian Tunggal Fraksi Semi Polar (F19-F23) Ekstrak Metanolik Meniran Terhadap Bakteri *E.coli*

Berdasarkan Gambar 2 dan Tabel 4 pengujian tunggal fraksi herbal meniran dengan dosis 15 μ l (Fx) pada bakteri *E.coli* tidak semua fraksi

memiliki ZOI. Fraksi yang memiliki ZOI yaitu F21 dengan ZOI $4 \pm 6,9$, diikuti F224 $\pm 6,9$, diikuti F23 dengan ZOI $4,6 \pm 8,0$.

Hasil Uji Zona Inhibisi Kombinasi Antara Herbal Meniran dengan Antibiotik Kloramfenikol dan Amoksisilin Terhadap Bakteri *E.coli*

Berdasarkan tabel 4 kombinasi antara herbal meniran dengan antibiotik kloramfenikol pada bakteri *E.coli* fraksi 19-23 didapatkan hasil yang tidak signifikan yaitu $p > 0,05$ setelah diukur dengan

Tabel 3 Rerata Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama Antara Fraksi Meniran dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *E. coli*.

Fraksi	Sampel	Rerata (mm) \pm SD	Jenis Interaksi
19	F19	$0,0 \pm 0,0$	ND
	C	$12,3 \pm 10,9$	
	F19C	$11,6 \pm 11$	
	F19F19	0 ± 0	
	CC	$16,3 \pm 4,9$	ND
	A	$0,0 \pm 0,0$	
	F19A	$0,0 \pm 0,0$	
	AA	$3,6 \pm 6,3$	
20	F20	0 ± 0	ND
	C	$4 \pm 8,1$	
	F20C	$9,3 \pm 8,1$	
	F20F20	$0,0 \pm 0,0$	
	CC	$9 \pm 7,9$	ND
	A	$0,0 \pm 0,0$	
	F20A	$0,0 \pm 0,0$	
	AA	$0,0 \pm 0,0$	
21	F21	$4 \pm 6,9$	ND
	C	$9,6 \pm 8,5$	
	F21C	16 ± 1	
	F21F21	$5,3 \pm 9,2$	
	CC	$14,3 \pm 5,1$	ND
	A	$4 \pm 9,2$	
	F21A	$4,6 \pm 8$	
	AA	$0,0 \pm 0,0$	
22	F22	$4 \pm 6,9$	ND
	C	$7,6 \pm 7$	
	F22C	$14,6 \pm 0,5$	
	F22F22	$0,0 \pm 0,0$	
	CC	$16,3 \pm 3,0$	ND
	A	$0,0 \pm 0,0$	
	F22A	$9,3 \pm 8$	
	AA	$4 \pm 6,9$	
23	F23	$4,6 \pm 8,0$	ND
	C	$4,3 \pm 7,5$	
	F23C	$15,6 \pm 6,3$	
	F23F23	0 ± 0	
	CC	$4,6 \pm 8$	ND
	A	7 ± 6	
	F23A	$8,6 \pm 7,5$	
	AA	$0,0 \pm 0,0$	

Pada pengujian fraksi herbal meniran tunggal dengan dosis $30 \mu\text{l}$ (FxFx) hanya fraksi 21 dengan ZOI $5,3 \pm 9,23$.

uji statistik non parametrik *Mann-Whitney Test* dan didapatkan jenis interaksi *not distinguishable*

Sama halnya dengan antibiotik kloramfenikol uji kombinasi antara fraksi meniran dengan antibiotik amoksisilin pada tabel 5, fraksi 19-23 didapatkan hasil yang tidak signifikan yaitu $p > 0,05$ setelah dilakukan uji statistik *Mann-Whitney Test*, dan dari semua fraksi tersebut memiliki jenis interaksi *not distinguishable*.

Tabel 2 Rerata Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi pada Pengujian Bersama Antara Fraksi Meniran dengan Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap Bakteri *S.aureus*.

Fraksi	Sampel	Rerata (mm) \pm SD	Jenis Interaksi
19	F19	$7,6 \pm 1,1$	ND
	C	$10,3 \pm 8,9$	
	F19C	$9,6 \pm 8,3$	
	F19F19	10 ± 1	
	CC	$10 \pm 8,6$	Sinergis
	A	6 ± 0	
	F19A	8 ± 1^a	
	AA	$6,6 \pm 0,5$	
20	F20	$12,3 \pm 1,5$	ND
	C	$15,6 \pm 0,5$	
	F20C	$15,6 \pm 1,5$	
	F20F20	$14,6 \pm 1,5$	
	CC	$19,3 \pm 2,5$	ND
	A	9 ± 1	
	F20A	11 ± 1	
	AA	$12,3 \pm 5,8$	
21	F21	$15 \pm 1,7$	ND
	C	$16,6 \pm 1,5$	
	F21C	$16 \pm 1,7$	
	F21F21	$17,3 \pm 3,7$	
	CC	$17,6 \pm 1,1$	ND
	A	0 ± 0	
	F21A	$15 \pm 1,7^a$	
	AA	0 ± 0	
22	F22	11 ± 2	ND
	C	13 ± 1	
	F22C	11 ± 1	
	F22F22	$13,3 \pm 1,1$	
	CC	$9 \pm 8,1$	Sinergis
	A	10 ± 1	
	F22A	$12,3 \pm 0,5^a$	
	AA	$13,3 \pm 3,5$	
23	F23	11 ± 2	Antagonis
	C	16 ± 1	
	F23C	$9,6 \pm 4,04^{ab}$	
	F23F23	10 ± 3	
	CC	$14,3 \pm 4$	ND
	A	$5 \pm 4,5$	
	F23A	$8,3 \pm 7,2$	
	AA	7 ± 6	

Keterangan: FxFx= uji zoi tunggal fraksi meniran dosis $30 \mu\text{l}$; Fx= uji zoi tunggal fraksi meniran dosis $15 \mu\text{l}$; CC= uji zoi tunggal kloramfenikol dosis $30 \mu\text{l}$; C= uji zoi tunggal kloramfenikol dosis $15 \mu\text{l}$; FxFx= uji zoi kombinasi fraksi meniran dan kloramfenikol; AA= uji zoi tunggal amoksisilin dosis $15 \mu\text{l}$; FxA= uji zoi kombinasi fraksi meniran dan amoksisilin dosis $15 \mu\text{l}$; A^{ab} signifikan terhadap A dan B (F23). ND = Not Distinguishable

PEMBAHASAN

Analisa Kandungan Senyawa Aktif Fraksi Semipolar Ekstrak Meniran F19-F23

Hasil dari uji fitokimia pada fraksi 19, 20, 21, 22, dan 23 didapatkan berbagai gambaran yang menunjukkan adanya senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman meniran. Reagen *Dragendorff* digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid yang ditandai dengan perubahan warna orange pada KLT sedangkan reagen FeCl_3 digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol dengan perubahan warna biru kehitaman dan reagen *formaldehid* digunakan untuk mendeteksi senyawa steroid dengan perubahan warna kuning kecoklatan^{9,10,11}. Berdasarkan hasil uji fitokimia didapatkan adanya kandungan fenol dengan penyempotan FeCl_3 pada fraksi 21, 22 dan 23. Sedangkan pada penyempotan dengan readeh *Dregendorff* dan *Formaldehyde* didapatkan hasil negatif.

Menurut Ibrahim et al (2013) kepolaran ekstrak methanol pada meniran dapat mengekstraksi lebih banyak senyawa terutama senyawa fenolik dan polifenolik¹⁶. Pada penelitian ini diduga senyawa antibakteri pada fraksi yang diteliti yaitu fenol. Senyawa fenol merupakan kelompok senyawa besar yang ada pada tanaman, senyawa ini memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan ditemukan didalam vakuola tanaman. Klasifikasi senyawa fenol yaitu senyawa fenol sederhana, asam fenolat dan aldehid, asetofenon dan asam fenilasetat, asam sinamat, koumarin, Flavonoid¹⁷. Komponen fenol yang terkandung dalam tanaman meniran ialah asam galat, *epicatechin*, *catechin*, *gallocatechin*, *epigallocatechin*, *epicatechin 3-O-gallate* dan *epigallocatechin 3-O-galla*.¹⁸.

Daya Hambat Tunggal Fraksi Semipolar Ekstrak Metanolik Meniran (F19-F23) Terhadap Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil uji ZOI tunggal pada fraksi semipolar (F19-F23) ekstrak metanolik meniran bahwa fraksi 19-23 memiliki zona inhibisi terhadap bakteri *S.aureus* maupun *E.coli*, namun lebih kuat pada bakteri *S.aureus*. Hal ini dibuktikan dengan lebih besarnya diameter zona inhibisi pada biakan bakteri *S.aureus*. Berdasarkan uji fitokimia yang memiliki senyawa antibakteri adalah fraksi 21, 22 dan 23 diduga mengandung senyawa fenol. Mekanisme antibakteri senyawa fenol dalam membunuh mikroorganisme yaitu dengan mendenaturasi protein sel¹⁹.

Kemungkinan senyawa yang terdapat pada fraksi 21, 22 dan 23 bersifat *broad-spectrum antibiotics* karena secara tunggal mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif. Menurut Ibrahim et al (2013) adanya aktivitas tanaman terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif dapat menjadi indikasi bahwa senyawa tersebut merupakan antibiotik spektrum luas atau bisa juga hanya toksin metabolik umum dalam tanaman. Hasil pada

penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim et al (2013) bahwa ekstrak methanol meniran (*P.niruri*) menunjukkan sifat antibakteri pada bakteri gram positif maupun gram negatif.¹⁶ Namun pada Bakteri gram positif lebih rentan terhadap ekstrak tanaman dibandingkan dengan bakteri gram negatif²⁰. Hal ini karena membran luar dan dalam bakteri gram negatif mengandung fosfolipid dan lipopolisakarida yang lebih tahan terhadap banyak zat lingkungan termasuk antibiotik²¹. Komponen tersebut tidak dimiliki oleh bakteri gram positif.

Senyawa fenol akan bekerja pada komponen bakteri yang tersusun dari protein seperti dinding sel dan membran sitoplasma. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak dan akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion didalam sel, sehingga sel menjadi lisis¹⁹.

Daya Hambat Kombinasi Fraksi Semipolar ekstrak Metanolik Meniran (F19-23) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol Terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil kombinasi pada fraksi 19, 20, 21, dan 22 dengan antibiotik kloramfenikol terhadap *S.aureus* didapatkan hasil *not distinguishable* yang berarti jenis interaksi tidak dapat dibedakan dan memiliki hasil yang tidak signifikan ($P > 0,05$) pada uji statistik Mann-Whitney Test. Hal ini karena hasil kombinasi herbal dan antibiotik memiliki rerata yang sama dengan herbal tunggal maupun antibiotik tunggal. Pada fraksi 23 didapatkan hasil antagonis dan memiliki hasil yang signifikan ($P < 0,05$) pada uji statistik Mann-Whitney Test. Hal ini karena rerata kombinasi herbal dan antibiotik tunggal lebih rendah dibandingkan dengan herbal tunggal maupun antibiotik tunggal.

Hasil dari penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa interaksi antara herbal meniran dengan kombinasi kloramfenikol pada bakteri *S.aureus* ialah interaksi sinergis, memiliki efek yang lebih kuat dalam membunuh bakteri²⁷. Senyawa fenol bekerja dengan cara merusak dinding sel sedangkan *chloramphenicol* bekerja pada protein 50S. Pada penelitian sebelumnya kombinasi amoxicillin yang bekerja terhadap dinding sel dan *chloramphenicol* menghasilkan efek sinergis²².

Mekanisme sinergis kombinasi fraksi 19 dengan amoksisilin dan fraksi 20 dengan amoksisilin yaitu antibiotik amoksisilin mampu merusak peptidoglikan bakteri *S.aureus* selanjutnya akan memfasilitasi fenol untuk masuk kedalam membrane sel dan mengaktifkan enzim litik yang menyebabkan bakteri menjadi lisis

Penelitian oleh Sanhuez et al (2017) menunjukkan bahwa interaksi senyawa fenol dari anggur dengan *chloramphenicol* terhadap *S.aureus* memiliki hasil sinergis dan dapat

menurunkan *Minimal inhibitory concentration* (MIC)²³. Senyawa fenolik yang paling banyak diidentifikasi dalam ekstrak anggur adalah quercetin, asam galat, asam protocatechuic dan luteolin, sedangkan senyawa fenolik dalam meniran yaitu asam galat, *epicatechin*, *catechin*, *gallocatechin*, *epigallocatechin*, *epicatechin 3-O-gallate* dan *epigallocatechin 3-O-gallate*^{7,23}. Nakayama et al menyatakan bahwa mekanisme *epigallocatechin 3-O-gallate* (EGCG) dapat memblokir terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan sejenisnya. Hal ini dapat menyebabkan menurunnya fungsi transporter seperti *phosphate ABC transporter binding protein*, *oligopeptide ABC transporter binding protein* dan *glucose-phosphate* dan berkurangnya penyerapan glukosa. Akibatnya ambilan glukosa bakteri berkurang dan bakteri tidak dapat bertahan hidup²⁴. Kemungkinan pada fraksi 23 tidak mengandung senyawa tersebut atau konsentrasi senyawa pada kombinasi terlalu rendah sehingga diameter kombinasi lebih rendah dibandingkan dengan diameter senyawa tunggal.

Berdasarkan hasil uji fitokimia fraksi senyawa 23 mengandung fenol yang bersifat bakteriosida, sedangkan antibiotik kloramfenikol merupakan antibakteri bakteristatik yang menghambat pertumbuhan sel sehingga mengakibatkan interaksi kedua senyawa tersebut antagonis. Sifat antagonis dari interaksi bakteristatik dan bakterisid bisa diakibatkan oleh beberapa faktor yakni berkurangnya dari aktivitas salah satu dari komponen akibat interaksi kedua obat, bakterisid lebih efektif membunuh multiplikasi bakteri sedangkan bakteristatik menghambat multiplikasi bakteri sehingga mengurangi efisiensi agen bakterisid, antibiotik bakteristatik menghambat pertumbuhan sel dari antibiotik bakterisid sehingga terjadi kurva waktu penghambatan akibat interaksi tersebut, waktu tersebut dimanfaatkan oleh bakteri untuk berevolusi menjadi mutasi resistensi terhadap obat^{25,26}.

Beberapa faktor bias yang dapat mempengaruhi penelitian adalah kelarutan antibiotik. Pada penelitian ini dalam melarutkan antibiotik hanya menggunakan aquadest pada kedua antibiotik seharusnya dalam melarutkan amoksisilin pada dilusi pertama menggunakan aquadest dan dilusi terakhir menggunakan dapar. Sedangkan pada antibiotik kloramfenikol dilusi pertama menggunakan pelarut etanol dan dilusi terakhir menggunakan aquadest. Selain itu tingginya standar deviasi juga dipengaruhi beberapa faktor diantaranya ketebalan plate dan pencampuran antibiotik yang tidak merata.

Sedangkan kombinasi pada bakteri *E.coli* Berdasarkan data yang didapatkan dari hasil pengolahan data melalui SPSS maupun AZDAST hasil kombinasi pada fraksi 19, 20, 21, 22, dan 23 dengan antibiotik amoksisilin maupun kloramfenikol terhadap *E.coli* didapatkan hasil *not distinguishable* yang berarti jenis interaksi tidak dapat dibedakan dan memiliki hasil yang tidak signifikan ($P > 0,05$) pada uji statistik Mann-

Whitney Test. Hal ini karena hasil kombinasi herbal dan antibiotik memiliki rerata yang sama dengan herbal tunggal maupun antibiotik tunggal. Hasil ini dapat terjadi akibat beberapa faktor salah satunya konsentrasi dari fraksi meniran yang dimasukkan ke dalam sumuran terlalu sedikit.

Menurut penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa interaksi antara herbal meniran dengan kombinasi kloramfenikol pada bakteri *S. aureus* dan *E. coli* adalah aditif atau tidak adanya interaksi dalam menurunkan atau meningkatkan KHM dan KBM.¹⁹ Sedangkan pada perhitungan nilai FICI ekstrak herbal meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan kombinasi amoksisilin pada bakteri *E. coli* adalah antagonis dan pada bakteri *S. aureus* hasilnya sinergis. Efek aditif sendiri diartikan ketika zat yang ditambahkan secara bersama dapat memperbaiki atau meningkatkan aktivitas obat meskipun tidak sekuat interaksi sinergis²⁷.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi Semi Polar (F19-23) Ekstrak Metanolik Meniran memiliki sifat antibakteri terhadap *S.Aureus* dan *E.coli*.
2. Fraksi Semi Polar F21-23 Ekstrak Metanolik Meniran mengandung senyawa fenolik
3. Kombinasi Fraksi Semi Polar F23 Ekstrak Metanolik Meniran dengan kloramfenikol didapatkan interaksi antagonis pada bakteri *S.aureus*

SARAN

Adapun saran untuk mengembangkan dan meningkatkan penelitian ini adalah:

1. Melakukan penelitian lanjutan uji fitokimia pada fraksi semi polar (F19-23) Ekstrak Metanolik (MeOH) Meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) dengan melakukan isolasi dan identifikasi senyawa fenol yang terkandung didalamnya.
2. Melakukan penelitian lanjutan uji *Zone of Inhibition* (ZOI) pada fraksi semi polar (F19-23) Ekstrak Metanolik (MeOH) Meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) menggunakan konsentrasi yang lebih besar untuk mempengaruhi daya hambat pada kombinasi Meniran (*Phyllanthus niruri*, L.) dengan antibiotik *amoxicillin*, dan *chloramphenicol* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada IOM dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah memberikan dana penelitian, dan tim penelitian yang telah membantu pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Mari Bersama Atasi Resistensi Antimikroba. Jakarta. 2016
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pengendalian Resistensi Antimikroba Jadi Perhatian Dunia. Jakarta. 2016.
3. World Health Organization. Global Plan Action. 2015
4. Inui T, Wang Y, Deng S, Smith DC, Franzblau SG, Pauli GF. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. *J Chromatogr A*.2007.
5. Adelia, Ira, Rio Risandiansyah, Faisal. Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Malang: UNISMA. 2018.
6. Muharram dan Nur J. Isolasi dan Identifikasi Sterol dari Ekstrak nHeksan Daun Meniran Hijau *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Jurnal Bionature*.2009. Hal 50 – 55.
7. Gaimei S, Ruiyang C, Lei S, Yixia Xu, Renbin S, Lanzhen Z, Yajian G. A Novel Phenolic Compound from *Phyllanthus emblica*. *Natural product communication*. 2013. 461-462
8. Notoatmodjo, S. Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta: Rineka Cipta. 2004.
9. A.E. Brechú-Franco, G. Laguna-Hernández, I. De la Cruz-Chacón, A.R. González-Esquínca. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. Mexico: *European Journal Of Histochemistry*. 2016.
10. J.B., Harbone. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (alih bahasa: Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro). Bandung: ITB. 2006.
11. Samuel G. Levine. *Journal of Chemical Education*. 1996
12. Parija. Textbook of Microbiology & Immunology. India: Elsevier. 2009.
13. Ziaei-Daroukalei N., Ameri M., Zhraei-Salehi T *et al*. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. USA: *National Center for Biotechnology Information*. 2016.
14. Reynolds J., College R. Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility. 2011
15. Wardati, F. Fadli Z., Risandiansyah, R. Efek Daya Hambat Kombinasi Fraksi F33-F37 *E.scabr* (Tapak Liman) dengan Antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*. Malang: UNISMA. 2019.
16. Ibrahim D., Hong LS and Kuppen N. Antimicrobial Activity of Crude Methanolic Extract from *Phyllanthus niruri*. Industrial Biotechnology Research Laboratory (IBRL). School of Biological Sciences. Universiti Sains Malaysia. 2013.
17. Vermerris, W. and Nicholson, R. Phenolic Compound Biochemistry, Springer, The Netherlands. 2006.
18. Ishimaru, K. Kayo, Y. Takashi, Y. Hiroshi, K. Koichiro, S. Phenolic Constituents In Tissue Cultures Of *Phyllanthus niruri*. Institute of Biological Science. University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibraki 305, Japan. 1991
19. Pelczar, M. J, Chan, E. C. S.,. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia Press. 1988.
20. Nor AS, Darah I, Shaida FS, Nurul AZ. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 cells by hexane extract of *Halimeda discoidea* (Decaisne) and the identification of its potential bioactive compounds. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. 872-881.
21. Inouye, S. Takizawa, T. and Yamaguchi, H. Antibacterial Activity of Essential Oil and their Major Constituents Against Respiratory by Gaseous Contact. 2001. 565-573.
22. Olajuyigbe OO, Coopoosamy RM, Afolayan AJ. Effects and time-kill assessment of Amoxicillin used in combination with chloramphenicol against bacteria of clinical importance. *Acta BiochimPol*. 2017. 1-5.
23. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. doi:10.1371/journal.pone.0172273. 2017
24. Nakayama T, Kajiya K, Hojo H, Suzuki M, Nanjo F, Kumazawa S. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. *J. Agric. Food Chem*. 2004
25. Ocampo PS, Lazar V, Papp B, Arnoldini M, Wlesch PAZ, Fekete RB, et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal.
26. Bollenbach T. Antimicrobial Interaction: Mechanisms and Implications for Drug Discovery and Resistance Evolution. *Curret Opinion in Microbiology*. 2015. 1-9
27. Pratiwi, S., T. Mikrobiologi Farmasi. Jakarta : Erlangga. 2008.